

茜草多糖 QA₂ 的分离纯化及组成分析

兰州军区后勤部药品检验所(730020) 王红霞* 王秉伋**

摘要 从东北茜草提取得到的粗多糖经离子交换、DEAE-纤维素和 Sephadex G-50 柱层析得到多糖 QA₂。QA₂ 经 HPLC 的 Ionpak S₈₀₃ 柱层析为单一对称峰,证明为均一多糖,并测得其分子量为 5 000。TLC 和 GC 分析表明 QA₂ 由 Rha、Ara、Xyl、Man、Glc 和 Gal 组成,其单糖摩尔比为 1.0 : 2.5 : 1.4 : 22.8 : 27.7 : 15.3。红外光谱分析含 β 型糖甙键。药理实验结果表明 QA₂ 具有较强的清除自由基的作用,清除率为 94.59%。

关键词 茜草 中性杂多糖 自由基清除

茜草为茜草科(*Rubiaceae*)茜草属植物茜草 *Rubia cordifolia* L. 的根及根茎,具有行血止血、通经活络、止咳祛痰之功效^[1]。茜草的化学成分主要是蒽醌及其衍生物,还有萘醌、萜类及环肽类化合物。药理实验表明茜草具有止血、抑菌、止咳祛痰、“升白”、抗肿瘤、抗心肌缺血等生物活性。但是关于茜草多糖的研究,国内外尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料:茜草 *Rubia cordifolia* L. 购于北京同仁堂药店,由军事医学科学院放射医学研究所孙仲诒高级工程师鉴定。

1.2 试剂:DEAE-纤维素(DE-22)为 Whatman 产品。已知分子量的 Dextran, Sephadex G-50 为 Pharmacia 公司产品。标准单糖为 E. Merck 产品。其它均为国产分析纯试剂。

1.3 仪器与方法

1.3.1 多糖的提取与纯化:茜草经水煎提取 3 次,合并滤液减压浓缩至于原生药比为 1 : 1.5,缓慢加入 95%乙醇,使乙醇终浓度为 30%,静置、离心、除去沉淀,上清液中加入 95%乙醇使乙醇终浓度为 75%,离心,沉淀常规脱水得粗多糖 Q。Q 经 DEAE-纤维素柱

层析(DE-22),依次用蒸馏水和 7%氨水洗脱,分为 QA 和 QB 两部分。QA 经大孔树脂(D-10)柱层析,以水为洗脱剂,Molish 反应阳性部分浓缩至适当浓度后加入 95%乙醇,使终浓度为 50%,静置,上清部分经 Sephadex G-50 柱层析(2.6 cm×100 cm)精制,以蒸馏水为洗脱剂,分管收集,Molish 反应检测,收集到 1 个单峰部分,冰冻干燥得 QA₂。

1.3.2 纯度鉴定及分子量测定^[2]:本实验用高效液相色谱法鉴定多糖纯度并测定其分子量。高效液相色谱仪为 Waters 244, Ionpak S₈₀₃ 色谱柱, Waters 401 型示差折光检测器。M-730 型微处理机。流动相为 0.1 mol/L Na₂SO₄,流速为 0.7 mL/min。

在色谱柱的排阻限以内,多糖分子量对数与保留时间成反比:LogM=a+bRT。以不同分子量的标准品多糖(Dextran 9 700, 10 500, 40 100)相继上柱,求出 a, b, 根据样品的保留时间即可算出其分子量。

1.3.3 部分理化性质的测定:通过硫酸咔唑^[3]反应和茚三酮反应分别检测己糖醛酸和氨基酸及肽的存在。

* Address: Wang Hongxia, Lanzhou Military Region Municipal Institute for Drug Control, Lanzhou

** 军事医学科学院放射医学研究所

1.3.4 QA₂的组成分析及摩尔比测定:QA₂的完全酸水解:称取QA₂ 10 mg,加入1 mol/L 硫酸1 mL于安瓿中,封管,水浴煮沸4 h,碳酸钡中和,离心,上清液浓缩,供薄层层析用。

薄层层析^[4]:薄层板为自制的含0.15 mol/L Na₂HPO₄,0.5% CMC的硅胶HF(青岛海洋化工厂生产)板。以丙酮-水(96:4)为展开剂,邻苯二甲酸-苯胺显色。完全酸水解后的QA₂与标准单糖鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖对照点样鉴定糖基组成。

气相色谱分析:将QA₂的完全酸水解产物彻底干燥后按文献^[5]方法制成相应的糖腈乙酸酯衍生物,用少量氯仿溶解后进样分析,与标准单糖的糖腈乙酸酯衍生物的保留时间对照鉴定糖基组成。气相色谱仪为HP 5890 Series II, FID检测器,OV-1(12 m×0.2 mm×0.33 μm)弹性石英毛细管柱,程序升温:165℃(8 min)7℃/min 210℃,气化室温度:260℃,FID温度:280℃,以氮气为载气,柱头压:68.94 kPa。

组成单糖的摩尔比测定^[6]:由于各种糖对检测器的响应值不同,因而测定糖基摩尔比需要先测定其定量校正因子。精密称取上述各标准单糖,使各单糖与内标的重量比在0.4~2.6之间的5个不同浓度,按前法制备糖腈乙酸酯衍生物并进行气相层析,求出各单糖的斜率b即定量校正因子($K = \frac{W_i/W_s}{A_i/A_s}$)。

样品的摩尔比测定条件与定量校正因子相同,以L-鼠李糖为标准测定各糖基的峰面积,乘以K/M(M为分子量),所得之值即为摩尔比。

1.3.5 QA₂ 甙键构型的分析:红外光谱用Bio-Rad FTs-65A 红外分析仪测定。测定方法为漫反射。

1.3.6 QA₂的清除自由基作用:

材料和方法:按照Fenton反应产生羟自

由基(OH·):5 μL 2 mmol/L FeSO₄,10 μL 0.8 mmol/L DMPD,5 μL 50 mmol/L EDTA,混合后加入5 μL H₂O₂,再加入25 μL 双蒸水或茜草多糖,混匀后立即装入石英毛细管,1 min后测定。

实验仪器及条件:仪器:ESP 300型ESR(自旋共振)波谱仪;温度:室温;CF(中心磁场):3 470GS;SW(扫宽):200GS;MF(调制频率):25 KHz;MA(调制幅度):1GS;CI(时间常数):84 s;P(功率):10 mW。

称取茜草多糖QA₂,加入双蒸水配制成浓度为100 mg/mL的溶液,分别以1:1(V:V)的比例加入羟自由基体系,以同样比例的双蒸水为空白对照,测定ESR波谱信号并计算清除率。

清除率以下式计算: $E(\%) = (h_0 - h_x) / h_0 \times 100$ h_0 是对照体系ESR波谱峰高, h_x 是加样品后对应峰的高度。

2 结果与讨论

2.1 QA₂为白色粉末,易溶于水。硫酸呋唑反应和茚三酮反应均呈阴性,证明不含己糖醛酸及氨基酸或肽。QA₂经HPLC分析,结果为单一对称峰(图1),证明为均一多糖。HPLC测得多糖分子量与保留时间的相关方程式为: $\text{Log}M = 9.16 - 0.39 \text{RT}$ (相关系数 $r = -0.9952$),保留时间 t_R 为13.84 min,计算得其分子量为5 000。元素分析C,H,N含量为40.84%、6.02%、0.06%,紫外扫描无260 nm的核酸特征吸收峰和280 nm的蛋白特征吸收峰。

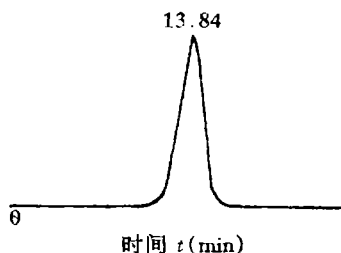


图1 多糖QA₂在Ionpak S₈₀₃柱上的HPLC图谱

2.2 薄层层析(图 2)

结果表明,QA₂ 的糖基组成为:鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖及半乳糖。气相色谱分析结果(表 1)与薄层层析结果完全一致。各单糖的定量校正因子结果为鼠李糖:0.7085;阿拉伯糖:0.6218;木糖:

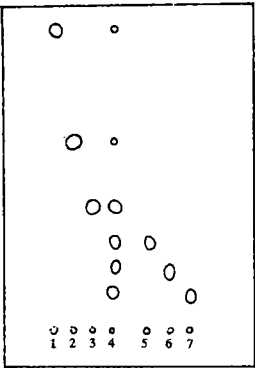


图 2 多糖 QA₂ 的薄层层析图
1-L-Rha 2-D-Xyl 3-L-Ara 4-QA₂ 5-D-Man
6-D-Glc 7-D-Gal

0.6816;甘露糖:0.5729;葡萄糖:0.6802;半乳糖:0.6477。糖基的摩尔比测定结果,鼠李糖-阿拉伯糖-木糖-甘露糖-葡萄糖-半乳糖为 1.0 : 2.5 : 1.4 : 22.8 : 2.77 : 15.3。

2.3 红外光谱分析 QA₂ 具多糖类物质的特征吸收峰,890 cm⁻¹处有 β-吡喃糖甙键的特征吸收峰,证明 QA₂ 结构中含 β 构型的糖甙键。

表 1 标准单糖及 QA₂ 水解单糖的糖腈乙酸酯衍生物在气相色谱上的保留时间

组成	保留时间 min	
	标准单糖	QA ₂ 水解单糖
1 L-Rha	5.44	5.45
2 L-Ara	5.73	5.71
3 L-Xyl	5.99	5.96
4 D-Man	11.63	11.68
5 O-Glc	11.87	11.91
6 D-Gal	12.35	12.39

2.4 药理实验表明 QA₂ 具有较强的清除自由基的作用,清除率为 93.2%。这对进一步研究茜草的药理作用和开发利用茜草可能有一定的意义。

参考文献

- 1 江苏新医院编. 中药大辞典. 下卷. 上海:上海科技出版社,1997.1567
- 2 陈轶兰,等. 军事医学科学院院刊,1988,12(11):70
- 3 Oische Z. J Biol Chem,1947,167:189
- 4 张惟杰主编. 复合多糖生化研究技术,上海:上海科学技术出版社,1987
- 5 李铁林,等. 分析化学,1982,10(5):272
- 6 孟延发,等. 生物化学杂志,1993,9(2):224

(1997-02-17 收稿)

Isolation, Purification and Structural Analysis of Polysaccharide
QA₂ from India Madder (*Rubia cordifolia*)

Wang Hongxia, Wang Bingji (Institute for Drug Control, Logistic Department of Lanzhou Military Head-quarter, 730020)

Abstract Polysaccharide QA₂ was isolated and purified by decocting with water, followed by alcohol precipitation and DEAE-cellulose, gel filtration chromatography (Sephadex G-50). Its homogeneity was proved by HPLC on Ionpak S₈₀₃ column, The average MW was 5000. According to TLC and GC analysis, QA₂ was composed of rhamnose, arabinose, xylose, mannose, glucose and galactose in molar ratio of 1.0 : 2.5 : 1.4 : 22.8 : 27.7 : 15.3. IR spectrum indicated that it has a β configuration. Preliminary pharmacological tests showed that QA₂ has strong scavenging effect on free radicals of hydrogen in the free radical OH[·] generating system. The scavenging ratio is 94.5%.

Key Words *R. cordifolia* L. Polysaccharide Isolation and Purification Free radical

• 补充 •

本刊 1 期 16 页“高效液相色谱法测定清宫龙凤宝中淫羊藿甙的含量”文中补充第二作者黄牧。